

C₁毒素非産生 *Clostridium botulinum* C 型菌の C₂毒素 産生及び孢子形成との関係について

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

芹 川 俊 彦

(昭和57年9月2日受付)

C₁毒素非産生 *Clostridium botulinum* C 型菌 8 株について、C₂毒素産生の有無をグルコース濃度 1.0 % の pre-reduced anaerobically sterilized - trypticase - yeast - glucose 培地 (PRAS - TYG 培地) の培養上清をトリプシン処理することにより検討した結果、全株共に C₂毒素を産生することが判った。また C₂毒素産生に関し、本培地はグルコース濃度 0.2 % の PRAS - TYG 培地、あるいは Egg meat 培地よりも良好であることが判った。培養時間とトリプシン処理による C₂毒素の活性化を検討した結果、C₂毒素は培養液中に非活性の形で放出され、培養期間中に培養液に含まれる何らかの酵素により活性化されることが判った。更に、C₂毒素産生と孢子形成の関係を検討した結果、孢子形成が多ければ多いほど C₂毒性が高く、培養液中の孢子数が 10⁴/ml 以下の場合には、C₂毒性は認められなかった。また、C₂毒素は対数増殖期には産生されず、孢子形成期に菌体内に産生され、孢子が成熟し、free spore になる過程に培養液中に放出されることが判った。

Key words *Clostridium botulinum* type C, Sporulation, Toxin production,
Clostridium botulinum C₂-toxin.

著者は 1974 年から 1976 年にかけて、石川県の湖沼地帯における *Clostridium botulinum* C 型菌の分布調査を実施し、C. *botulinum* C 型菌が本県に広範囲に分布することを明らかにすると共に、多数の C 型菌を河北潟の土壌から分離した¹⁾。その際、Hungate²⁾の方法に従い厳密な嫌気条件下で作製した (pre-reduced anaerobically sterilized, 以下 PRAS と略) 毒素産生用クックトミート培地³⁾においても、C. *botulinum* C 型菌の主毒素である C₁毒素を産生しない菌株を 8 株分離した。これらの菌株は C₁毒素を産生しない外は、培養性状、生化学性状が C 型菌と全く同一であり、更に C 型菌に特異的な抗菌血清に対し被凝集性を示すことから、これら 8 菌株を C 型菌の無毒株と同定した¹⁾。一方、Eklund ら³⁾は C₁毒素非産生 C. *botulinum* C 型菌株の中には、培養菌液をトリプシンにより処理するこ

とにより C₂毒素を証明出来得る菌株が存在することを報告した。著者は上述の Eklund らの知見に基づき、土壌から分離した 8 菌株の無毒株について、嫌気的な要求度が高い C 型菌の発育に最適である PRAS 培地を用い、C₂毒素産生を検討した。また、本研究の途次、C. *botulinum* C 型菌の C₂毒素産生が孢子形成と密接に関係していることが示唆されたので、両者の関係についても併せて検討した。

材料及び方法

I. 被験菌株

河北潟の土壌から著者が分離した C₁毒素非産生 C. *botulinum* C 型菌 8 株、85-14、85-18、86-16、86-18、86-19、92-13、98-1、98-2¹⁾を用いた。

II. 使用培地

C₂-Toxin Production by *Clostridium Botulinum* Type C Having No C₁-Toxigenicity and the Relation of C₂-Toxigenesis with Sporulation Frequency. Toshihiko Serikawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

毒素産生用培地としてグルコース濃度 1.0 % の PRAS - trypticase - yeast - glucose 培地 (以下 PRAS - TYG 培地と略) を用いた。本培地は, Eklund ら³⁾が C_2 毒素の検討に用いた TYG 培地の組成, 即ちトリプテケースペプトン (BBL) 3 % (W/V), 酵母エキス (Difco) 2 % (W/V), グルコース 0.2 %, 塩酸システイン 0.1 % を基礎とし, この外更にグルコース 0.8 %, 緩衝系として Na_2CO_3 0.4 %, KH_2PO_4 0.045 %, K_2HPO_4 0.045 %, 塩類として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.09 %, NaCl 0.09 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.009 %, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.009 %, 酸化還元指示薬としてレザズリン 0.0001 % を添加したものである。本培地は, ガス噴射装置⁴⁾を用い, CO_2 存在下で中試験管 (16×160 mm) に 8 ml ずつ分注し, プチルゴム栓をして 115°C, 15 分間高圧滅菌することにより作製した。なお, 比較培地としてグルコース濃度 0.2 % の PRAS - TYG 培地, 及び *C. botulinum* C 型菌の発育が良好である Egg meat 培地 (Difco) ⁵⁾を用いた。

III. 植菌及び培養

肝片加肝ブイオンで 16 時間前培養した菌液 0.2 ml を, 中試験管中のグルコース濃度 1.0 % または 0.2 % の PRAS - TYG 培地 8 ml に CO_2 噴射下で植菌し, または中試験管中の Egg meat 培地 10 ml に大気下で植菌した後, CO_2 存在下で培養を行った。また, 培養菌液の遠心上清液 (450×g, 15 分間) を毒素液とした。

IV. 毒力の測定及びトリプシンによる毒素の活性化

毒力の測定は, 0.02 %ゼラチン加 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で 2 倍段階希釈した試料 0.25 ml をマウスの尾静脈に注射し, 3 日間生死を観察し minimum lethal dose (MLD)/ml を求めた。毒素の活性化は, 培養上清液を等量の 0.5 %トリプシン溶液と混合し, 37°C, 1 時間反応させることにより行った³⁾。トリプシン溶液は, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) 100 ml にトリプシン (Difco, 1 : 250) を 0.5 g 溶解したものをを用いた。なお, トリプシン溶液に等量の生理食塩水を混合し, その 0.25 ml をマウスの尾静脈に注射したが, マウスは何ら異常を示さなかった。また, トリプシン処理後の試料は 4°C において保存したが, その毒素活性は安定で, 1 週間後においても MLD/ml の値は変化しなかった。

V. 抗毒素血清及び中和試験

C. botulinum C 型菌の C_1 , C_2 毒素おのおのに対する抗毒素血清は, 大阪府立大学阪口玄二博士より分与を受けた。なおこの抗 C_2 毒素血清は, Eklund ら³⁾の報告した抗 C_2 毒素血清と同一であることが確認されたものである。*C. botulinum* A, B, D, E 型抗毒素血清は千葉県血清研究所近藤久博士より分与されたものを

使用した。*C. novyi* A, B 型抗毒素血清は Wellcome research laboratories (英国) より購入した。中和試験は, 毒素液と等量の抗血清を混合し 37°C, 30 分反応させた後, 0.5 ml をマウスの腹腔内あるいは尾静脈内に注射することにより行った。

VI. 総生菌数及び孢子数の測定

総生菌数の測定は以下の方法により行った。試料を PRAS 希釈液 (Na_2CO_3 0.24 %, KH_2PO_4 0.045 %, K_2HPO_4 0.045 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.09 %, NaCl 0.09 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.045 %, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.09 %, 塩酸システイン 0.045 %, レザズリン 0.0001 %を含む) で 10 倍段階希釈し, その 0.1 ml を 5 ml の VL 培地⁶⁾ (milieu a l'extrait de viande et de levures) にグルコースを添加した VLG 培地を基礎として作製した PRAS 変法 VLG 培地⁴⁾に CO_2 噴射下で植菌し, これを直ちに Hungate⁷⁾に従い roll tube 法を用いて, CO_2 存在下で中試験管内壁にフィルム状に拡げて固め, 24 時間培養した。培養後管壁に発育したコロニーを計算し, colony-forming unit (CFU)/ml で表した。孢子数の測定は, 試料を 75°C, 15 分間加熱した後, 上述の方法に準じて行い, sporulation frequency として表した。

VII. 顕微鏡下での孢子の観察

培養菌液を 450×g, 15 分間遠心後, 沈渣に対し Wirtz の孢子染色⁸⁾を行い顕微鏡下で観察した。

VIII. 菌の発育及び pH の測定

菌の発育は, その濁度を島津ボッシュロム・スペクトロニク・20 光電比色計を用い OD_{560} にて測定した。培地の pH は Zeromatic SS-3 メータ (東芝ベックマン) により測定した。

IX. 菌体内の毒素検索

培養菌液を遠心集菌後, 沈渣を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で 2 回遠心洗浄し, 培養液と等量の同緩衝液に浮遊させた後, 超音波細胞破碎機 (UR-200 型, トミー精工) を用い, 20 キロサイクルで 5 分間処理することにより細胞を破壊した。超音波処理液を 3,000×g, 20 分間遠心し, その上清液についてトリプシン処理を行った後に毒性を測定した。

成 績

I. PRAS - TYG 培地における毒素産生及び毒素中和試験

まず, グルコース濃度 1.0 % の PRAS - TYG 培地を用い, 被験 8 株について毒素産生の有無を検討した。本培地で 37°C, 1 週間培養した後, 培養上清をトリプシンで活性化し, その 0.25 ml をマウス尾静脈に注射し, 致死毒性を検討した結果, 被験 C_1 毒素非産生 *C. botulinum* C 型菌 8 株中 1 株 (85-14 株) を除きマウスに

Table 1. Production of C₂-toxin in different media by *C. botulinum* type C strains producing no C₁-toxin

Strain	C ₂ -toxicity in the culture* supernatant of					
	PRAS-TYG medium** containing 0.2% glucose		PRAS-TYG medium containing 1.0% glucose		Egg meat medium	
	Without trypsi- nization	With trypsi- nization	Without trypsi- nization	With trypsi- nization	Without trypsi- nization	With trypsi- nization
85-14	0***	0	0	0	0	0
85-18	8	64	32	64	0	32
86-16	16	32	64	64	0	64
86-18	4	32	16	128	0	64
86-19	8	32	0	32	0	64
92-13	32	32	16	64	0	64
98- 1	8	64	256	256	0	64
98- 2	8	16	64	64	0	64

*: Incubative period; 7 days

**: PRAS-TYG medium; Pre-reduced anaerobically sterilized trypticase-yeast-glucose medium

***: MLD/ml

致死毒性を示した。この致死毒性に対し、*C. botulinum* 抗 A, B, C₁, C₂, D, E 型毒素血清、及び *C. novyi* 抗 A, B 型毒素血清を用いて中和試験を行ったが、この致死毒性は抗 C₂ 毒素血清によってのみ特異的に中和され、これらの C₁ 毒素非産生 *C. botulinum* C 型菌 8 株中 7 株は、*C. botulinum* C₂ 毒素を産生することが判った。

II. C₂ 毒素産生条件

グルコース濃度 1.0% の PRAS-TYG 培地において C₂ 毒素が産生されることが判ったので、次にグルコース濃度 0.2% の PRAS-TYG 培地、並びに Egg meat 培地を併用して、C₂ 毒素産生条件を検討した。上記の 3 種の培地を用い、37°C、1 週間培養後の培養上清について、トリプシン無処理及び処理後の C₂ 毒性を測定した。その結果、トリプシン処理を行った場合、Egg meat 培地においてもかなり高い C₂ 毒性が認められたが、86-19 株を除き、1.0% グルコースの PRAS-TYG 培地において最も高い C₂ 毒性が認められた (表 1)。0.2% グルコースの PRAS-TYG 培地においても C₂ 毒素産生が認められたが、1 株 (85-18 株) を除き、その値は低かった。なお、85-14 株は本実験においてもいずれの培地でも C₂ 毒性を示さなかった。トリプシン無処理の場合には、Egg meat 培地においては全く C₂ 毒性は認められなかったが、PRAS-TYG 培地ではグルコース濃度 0.2% の場合には C₂ 毒素産生株 7 株全株共に、また 1.0% グルコースの場合には 7 株中 6 株が C₂ 毒性を示した。しかしながら、その C₂ 毒性の値はトリプシン処理後の値に比べ低い場合が多く、グルコース

Table 2. Production of C₂-toxin in 24 hr culture in PRAS-TYG medium containing 1.0% glucose

Strain	C ₂ -toxicity in 24 hr culture supernatant of PRAS-TYG medium containing 1.0% glucose	
	Without trypsi- nization	With trypsi- nization
85-14	0*	0
85-18	0	64
86-16	0	8
86-18	4	128
86-19	0	32
92-13	0	64
98- 1	8	256
98- 2	0	64

*: MLD/ml

濃度 0.2% の場合には 7 株中 6 株、またグルコース濃度 1.0% の場合は 7 株中 4 株がトリプシン処理後に比べ低い C₂ 毒性を示した。以上の結果、C₂ 毒素産生に関しグルコース濃度 1.0% の PRAS-TYG 培地は、0.2% グルコースの場合よりもあるいはまた Egg meat 培地よりも、良好であることが判ったので、以後の実験においては 1.0% グルコースの PRAS-TYG 培地を用いることとした。

上記の実験中、1.0% グルコースの PRAS-TYG 培

地における菌の発育は、培養 24 時間以内に最大値に達することが観察されたので、24 時間培養液についてトリプシン無処理及び処理後の C_2 毒性を検討した (表 2)。培養 24 時間ではトリプシン無処理の場合、ほとんどの菌株において毒性を示さなかったが、トリプシン処理を行った場合、86—16 株の 1 株を除き全株が 1 週間培養と同一の毒力 (1 週間培養と同じ値) を示した。以上の結果、並びに表 1 に示した 1.0 % グルコースの PRAS—TYG 培地における 1 週間培養液についての C_2 毒性の検討結果から、 C_2 毒素は先ず非活性の状態で培養液中に放出され、培養液中に含まれる何らかの酵素によって培養時間と共に活性化されることが判った。また C_2 毒素の培地への放出には 48 時間の培養時間で充分であることも判明した。

III. 孢子形成と C_2 毒素産生

毒素産生条件を検討した上述の実験の際、グルコース濃度 1.0 % の PRAS—TYG 培地を繰り返し作製して C_2 毒性を検討したが、その毒性が作製した培地ロッ

トにより異なる事実に遭遇した。この際、これらの遠心沈渣について孢子染色を行ったところ、高い毒素産生を示した培養液の染色標本には多数の孢子が認められたのに反し、毒素産生が低い場合には少数の孢子しか認められなかった。このことから、孢子形成が C_2 毒素産生と密接に関係しているのではないかと思われた。例えば、表 3 は 98—1 株について行った 6 回の実験をまとめ C_2 毒性と孢子数との関係を調べたものである。即ち、98—1 株を 1.0 % グルコースの PRAS—TYG 培地で 24 時間あるいは 48 時間培養した培養液中の C_2 毒性と孢子数との関係を調べた結果、6 回の実験のうち 4 回は 10^7 /ml の孢子を認め、且つ 256—512 MLD/ml の C_2 毒性を示したが、他の 2 回においては少数の孢子を認めたに過ぎず、それに比例して毒性も低かった。表 4 には更に、被験 8 株全株について 1.0 % グルコースの PRAS—TYG 培地で 24 時間あるいは 48 時間培養した培養液中の C_2 毒性と孢子数との関係を、6—7 回にわたって調べた成績を示した。その結果から、孢子数が 10^4 /ml 以下の培養液中にはマウスに対する致死毒性は認められなかったが、 10^6 /ml 以上のものについては確実に C_2 毒性が認められ、且つ孢子数が増加するにつれて C_2 毒性も増加し、孢子数と C_2 毒性は密接に関係することが判った。先の実験で C_2 毒素産生を認めなかった 85—14 株は、6 回の実験のうち 4 回は孢子数が 10^4 /ml 以下を示し、毒性も認めなかったが、2 回の実験において 2.6×10^6 , 3.2×10^6 /ml の孢子形成を認め、同時におのおの 16, 8 MLD/ml の致死毒性を認めた。また、本毒素は抗 C_2 毒素血清によってのみ中和され、本菌株も C_2 毒素産生株であることが判った。孢子形成はまた培養液の pH と関係しており、培養液の pH が 6.0 以上の時、孢子数は 10^7 /ml 以上の値を示す場合が多かった。また、48 時間培養から得られた菌体細胞の超音波処理抽出液中には、全株について C_2 毒性を認めることが出来なかった。

Table 3. Sporulation frequency and C_2 -toxicity of strain 98-1

Case	Bacterial growth (OD ₅₅₀)	Viable counts after heating at 75°C for 15 min (CFU*/ml)	Toxicity** (MLD/ml)
1	1.46	2.0×10^5	4
2	1.40	3.0×10^5	8
3	1.32	1.0×10^7	256
4	1.32	3.4×10^7	512
5	1.31	4.0×10^7	512
6	1.36	5.7×10^7	512

*: Colony-forming unit

**: Trypsin-activated

Table 4. Sporulation frequency and C_2 -toxicity of *C. botulinum* type C strains producing no C_1 -toxin

Sporulation frequency (level/ml)	No. of cases	Toxicity* (MLD/ml)									
		0	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Less than 10^4	4	4**	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^5	11	0	2	3	4	1	1	0	0	0	0
10^6	20	0	0	6	2	8	4	0	0	0	0
10^7	15	0	0	0	0	0	0	4	2	7	2
10^8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

*: Trypsin-activated

**: Number of cases showing each level of toxicity

Table 5. Sporulation and C₂-toxin production by type C strain 98-1

Incubation period (hr)	Bacterial growth (OD ₅₆₀)	pH	Viable counts after heating 75°C for 15 min (CFU*/ml)	Toxicity** (MLD/ml)	
				Intracellular	Extracellular
0	0.08	6.70	1.3×10^4	0	0
4	0.16	6.50	1.0×10^4	0	0
6	0.70	6.30	5.9×10^3	0	0
8	1.52	5.85	5.7×10^3	0	0
10	1.55	5.90	8.4×10^3	0	0
12	1.54	6.20	8.3×10^3	0	0
14	1.50	6.20	3.2×10^6	128	4
16	1.50	6.00	7.7×10^6	128	256
18	1.40	6.06	1.4×10^7	128	512
20	1.40	6.10	3.4×10^7	64	512
22	1.40	6.05	3.6×10^7	64	512
24	1.40	6.03	3.0×10^7	64	512
48	1.36	6.20	5.7×10^7	0	512
168	1.16	6.20	4.3×10^7	0	512

*: Colony-forming unit

**: Trypsin-activated

次いで、C₂毒素が孢子形成と関連し増殖のいかなる時期に産生されるのかを検討するため、毒素産生が被験菌株の中で最も高い98-1株を用い、培養時間、菌の発育、孢子形成、及びC₂毒素産生の関係について検討した(表5)。肝片加肝ブイヨンで16時間前培養した菌液0.2mlを、20本のグルコース濃度1.0%のPRAS-TYG培地(8ml)に植菌し37°Cで培養を行った。菌の増殖はOD₅₆₀にて測定し、最高値に達するまでは1時間毎、以後24時間目までは2時間毎、1週間目までは1日毎に測定した。またC₂毒素に関しては、培養24時間目まで2時間毎に、以後1週間目まで1日毎に1本の培地を抜き取り毒性を測定し、同時にpH、総生菌数、孢子数を測定した。OD₅₆₀は培養3時間目から増加を認め、10時間で最高値に達し、以後1週間の間ゆるやかな減少を示した。孢子数は培養12時間目までは $10^3 \sim 10^4$ /mlの値を示したに過ぎず、顕微鏡的には孢子を認めることは出来なかった。この時(12時間目)まではC₂毒性も認められなかった。培養14時間目の培養液において、孢子数が 3.2×10^6 /mlとなり、顕微鏡的にも孢子を認めることが出来たが、95%以上の孢子はsporangiaの中に存在した(図1)。この時期において、C₂毒性は菌体内及び培養液中に共に認められたが、培養上清におけるC₂毒性はわずか4MLD/mlに過ぎず、菌体内に128MLD/mlと高い毒性が認められた。

16時間培養では、孢子数は14時間培養時の約2倍に増加し、顕微鏡的にはfree sporeが増加し全孢子数の約17%を占めるに致った。この時期においては、培養上清中のC₂毒性は急激に増加した(256MLD/ml)。18時間培養においては、孢子数は更に約2倍になり、free sporeも増加して全体の50%以上を示した。この時期に培養上清中のC₂毒性は最大値の512MLD/mlに達した。20時間以後の培養においては、孢子数はほぼ一定であったが、時間の経過と共にfree sporeの割合は増加し、48時間培養で90%以上(図2)、1週間培養ではfree sporeのみとなった。C₂毒性に関しては、20時間以後培養上清中の毒性は最大値(512MLD/ml)を示し一定であったが、菌体内の毒性は14時間で最大値(128MLD/ml)に達した後は20時間目から減少し、48時間培養以後には認めることが出来なかった。以上の結果、C₂毒素は先ず孢子形成初期に産生され菌体内に蓄積し、その後数時間以内に、free sporeの増加に伴い、培養液中に放出されることが示唆された。なお、上述の実験は3回繰り返したが、ほぼ同様の成績を示した。

考 察

先に著者によってC. botulinum C型菌の無毒株として同定された8株は、全株共にグルコース濃度1.0%

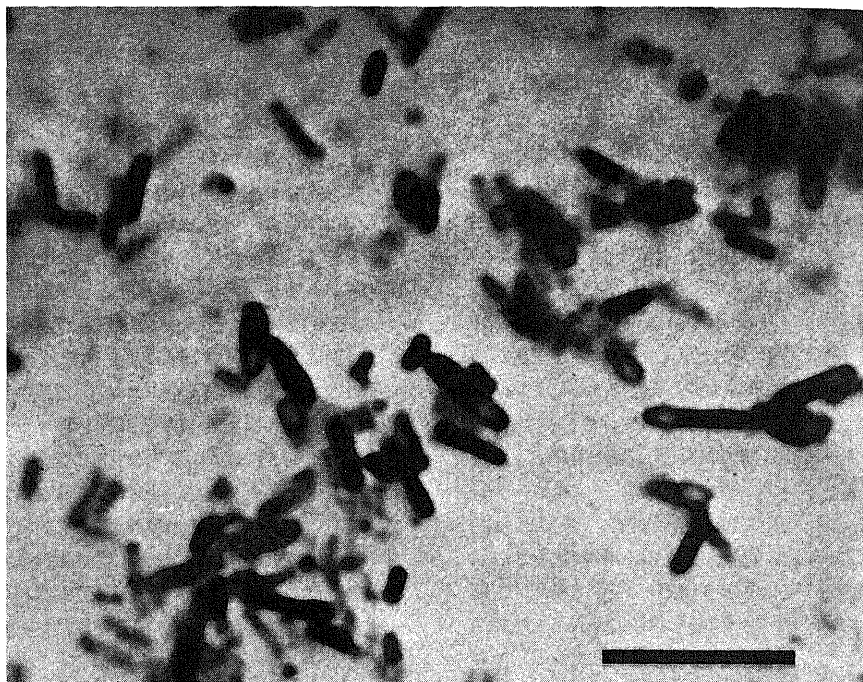


Fig. 1. *C. botulinum* type C strain 98-1; 14-hr culture in PRAS-TYG medium.
 $\times 1,000$ (bar, $10\ \mu\text{m}$).

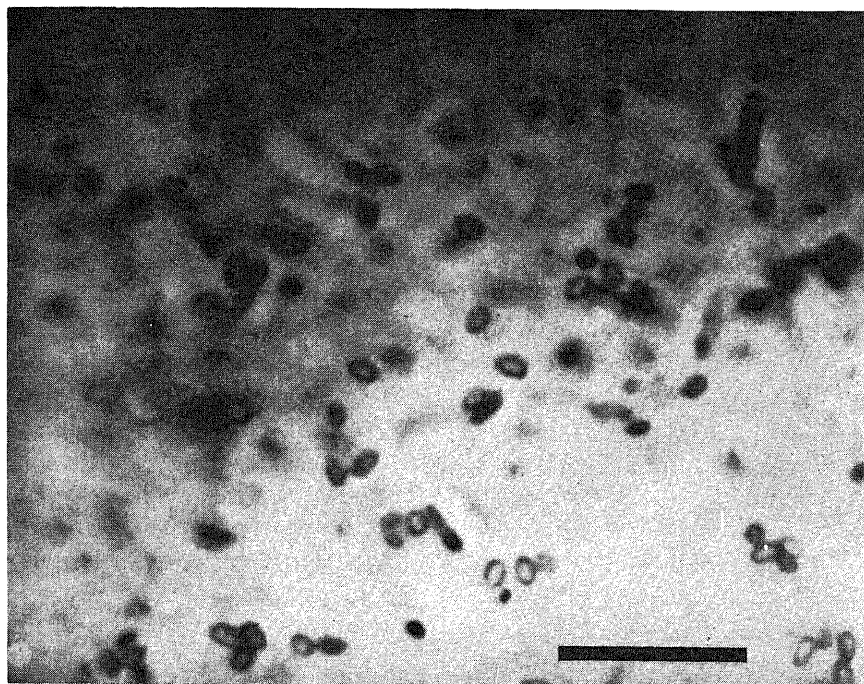


Fig. 2. *C. botulinum* type C strain 98-1; 48-hr culture in PRAS-TYG medium.
 $\times 1,000$ (bar, $10\ \mu\text{m}$).

の PRAS - TYG 培地における培養上清をトリプシン処理することにより、C₂毒素を産生することが明らかとなった。C. botulinum C α 型は C₁, C₂毒素を、C β 型は C₂毒素のみを産生するという Jansen の記載⁹⁾によれば、これらの菌株は、C. botulinum C β 型ということになる。

C₂毒素産生に関して Eklund ら³⁾はグルコース濃度を 1.0 % にすると、C₂毒素産生は抑制されると報告した。しかるに本研究においては、グルコース濃度 1.0 % の方が C₂毒素産生が促進されたが、これは Eklund らが使用した TYG 培地に緩衝系が含まれておらず、そのためグルコース濃度を 1.0 % にした場合、発育は良好になるが培地 pH が著しく下り、その結果孢子形成は敏感に pH の影響をうけて抑制され、孢子形成と密接な関係を持つ C₂毒素産生が低下するものと考えられる。この点、著者の使用した PRAS - TYG 培地は緩衝系が含まれるため pH が低下しにくく、且つまた発育も良好であったので、C₂毒素産生用培地として適していると思われる。

C₂毒素は、孢子形成期に菌体内に産生され free spore の増加に伴い非活性の状態で培養液中に放出された後、培養液中の何らかの酵素によって活性化されるものと考えられる。このように、毒素産生と孢子形成が密接に関係しているものとしては、C. histolyticum の毒素原性と孢子形成との関係があり、孢子形成が良好な菌株は強毒株であり、孢子形成が不良な菌株は弱毒株であると報告⁹⁾¹⁰⁾されている。また C. perfringens のエンテロトキシン産生は、孢子形成と密接に関係しており、更にこの毒素は spore coat 蛋白成分であると報告¹¹⁾されている。C₂毒素もまた孢子形成期にのみ産生されるものであるが、この毒素が孢子成分であるか否かは今後の研究課題である。

結 論

河北潟の土壌から分離した C₁毒素非産生 C. botulinum C 型菌 8 株について、グルコース濃度 1.0 % の PRAS - TYG 培地を用い、C₂毒素産生の検討を行った。その結果、培養上清のトリプシン処理により、8 株全株に毒素が認められ、この毒素は抗 C₂毒素血清によってのみ特異的に中和されたことから、これらの菌株は C. botulinum C₂毒素を産生することが判った。C₂毒素産生には PRAS - TYG 培地が適しており、グルコース濃度は 0.2 % よりもむしろ 1.0 % の方が良好であった。また、C₂毒素産生は孢子形成と密接な関係があることが判った。即ち、孢子数が多ければ多い程毒性が高く、マウスに対する致死毒性を示すには、培養液中に 10⁵/ml 以上の孢子数を認めることが必要であつ

た。また、この毒素は対数増殖期に産生されず、孢子形成と同時に産生された。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を戴いた西田尚紀教授に心から御礼申し上げます。また実験の遂行にあたり終始直接御指導御助言を戴いた微生物学教室中村信一助教授はじめ多大な御協力を戴いた微生物学教室員各位並びに石川県衛生公害研究所微生物部木村晋亮部長に深く感謝の意を表します。また、C. botulinum 抗 C₁, C₂毒素血清の分与を受けた大阪府立大学農学部阪口玄二博士、抗 A, B, D, E 型毒素血清の分与を受けた千葉県血清研究所近藤久博士に謝意を表します。

文 献

- 1) 芹川俊彦：石川県湖沼地帯における *Clostridium botulinum* C 型の分布。十全医会誌，86，245 - 255 (1977)。
- 2) Hungate, R. E. : The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol. Rev., 14, 1 - 49 (1950)。
- 3) Eklund, M. W. & Poysky, F. T. : Activation of a toxic component of *Clostridium botulinum* types C and D by trypsin. Appl. Microbiol., 24, 108 - 113 (1972)。
- 4) 東量三：ガス噴射法—新しい嫌気性菌培養法。メディア・サークル，11, 169 - 183 (1966)。
- 5) Segner, W. P., Schmidt, C. F. & Boltz, J. K. : Enrichment, isolation, and cultural characteristics of marine strains of *Clostridium botulinum* type C. Appl. Microbiol., 22, 1017 - 1024 (1971)。
- 6) Buttiaux, R., Beerens, H. & Tacquet, A. : Manuel de techniques bactériologiques, 2d ed., p 436, Éditions Médicales Flammarion, Paris, 1966。
- 7) Wirtz, K. : Eine einfache Art der Sporen-färbung, Zentbl. Bakt. Parasitkde, I Abt. Orig., 46, 727 - 728 (1908)。
- 8) Jansen, B. C. : The toxic antigenic factors produced by *Clostridium botulinum* types C and D. Onderstepoort J. Vet. Res., 38, 93 - 98 (1971)。
- 9) 今泉昌明・西田尚紀：Cl. histolyticum の毒素原性と孢子形成能。医学と生物学，70, 1 - 5 (1965)。
- 10) Sebald, M. & Schaeffer, P. : Toxinogenèse et sporulation chez *Clostridium histolyticum*. C. R. Acad. Sc., 260, 5398 - 5400 (1965)。
- 11) Frieben, W. R. & Duncan, C. L. : Homology between enterotoxin protein and spore structural protein in *Clostridium perfringens* type A. Eur. J. Biochem., 39, 393 - 401 (1973)。

C₂-Toxin Production by *Clostridium Botulinum* Type C Having No C₁-Toxigenicity and the Relation of C₂-Toxigenesis with Sporulation Frequency Toshihiko Serikawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. Jusen Med. Soc., **91**, 687—694 (1982)

Key words: *Clostridium botulinum* type C, Sporulation, Toxin production, *Clostridium botulinum* C₂-toxin.

Abstract

Clostridium botulinum type C strains with no C₁-toxigenicity were reexamined for C₂-toxigenicity and all the 8 strains tested were found to be C₂-toxigenic. Pre-reduced anaerobically sterilized trypticase-yeast-glucose medium (PRAS-TYG) containing 1% glucose was used for the production of C₂-toxin, because the toxin was yielded at higher levels by *C. botulinum* type C cultured in this medium than those in two other media tested, PRAS-TYG containing 0.2% glucose and egg meat medium. The culture fluid was trypsinized to activate C₂-toxin. The present study on toxin production revealed that C₂-toxin was activated by some enzyme(s) in the culture medium after the toxin was issued out of cells. The production of C₂-toxin appeared to be closely related with sporulation frequency of *C. botulinum* type C: the higher the sporulation frequency, the higher the yield of C₂-toxin was. The toxin was not produced during the log-phase, but it was produced during the sporulating period and then excreted into the medium as spore maturation proceeded. The toxin was not produced when the sporulation frequency was less than 10⁴/ml.